Aus dem Pharmakologischen Institut der Hansischen Universität
im Universitäts-Krankenhaus Hamburg-Eppendorf
Direktor: Professor Dr. K e e s e r

Untersuchungen über die diuretische Wirksamkeit einiger Purinderivate an der weißen Maus

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Hansischen Universität Hamburg

vorgelegt von

Zahnarzt ERNST HUTTARD
aus Hamburg

Hamburg 1939

1. Berichterstatter: Dozent Dr. Oelkers

2. Berichterstatter: Professor Dr. Keeser

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Hansischen Universität Hamburg

Dissertationsdruck: A. Preilipper, Hamburg 11, Admiralitätstraße 16

Purinderivat Theophyllin ist eins der stärksten Diuretica. In neuerer Zeit werden Theophyllinum und sein besser lösliches Doppelsalz Theophyllino-natrium aceticum weniger gebraucht und dafür einige im Handel befindliche Präparate wie Novophyllin und Euphyllin verwendet. In diesen Präparaten wird Theophyllin durch einen Zusatz von Aethylendiamin in verhältnismäßig hoher Konzentration in Lösung gehalten.

Es sollte nun geprüft werden, in welcher Weise sich dieser Zusatz in den Präparaten auf die diuretische Wirksamkeit des Theophyllins auswirkt.

Die Versuche wurden an weißen Mäusen durchgeführt. Nach Bonsmann[1] eignet sich die weiße Maus bei geeigneter Versuchsanordnung sehr gut zur Prüfung diuretisch wirkender Mittel, eine Angabe, die H. Finger[2] bei ausgedehnten Versuchen in unserem Institut voll bestätigen konnte. Hinzu kommt, daß die Tiere billig und im allgemeinen leicht zu beschaffen sind. Gegenüber Versuchen mit Hunden besteht noch der Vorteil, daß die Versuchsergebnisse nicht durch eventuelles Erbrechen beeinflußt werden. Ferner werden bei der Verwendung von zahlreichen Tiergruppen, statt einzelner Hunde, Fehler durch individuelle Verschiedenheiten der Tiere herabgemindert.

Für unsere Versuche dienten uns 24 Gruppen von jeweils sechs männlichen Mäusen. Bei der Zusammenstellung dieser Gruppen wurde darauf gesehen, daß die Gewichtsdifferenz der einzelnen Tiere in einer Gruppe nicht mehr als 2 g betrug. Als besonders geeignet erwiesen sich 14 bis 15 g schwere Tiere. Zwei Stunden vor Beginn des Versuches wurde den Tieren Nahrung und Wasser entzogen. Es ist erforderlich, den Tieren während der ganzen Versuchsdauer die gleiche Nahrung zu verabfolgen und die Versuche täglich zu der gleichen Zeit anzusetzen, da diese Umstände nach unserer Erfahrung Einfluß auf die Versuchsergebnisse haben. Wir ernährten daher unsere Mäuse während der Dauer der Versuche mit einem Gemisch von Haferflocken und Hirse.

Nachdem dann die Mäuse zwei Stunden ohne Futter und Wasser geblieben waren, wurde bei jeder Maus die Harnblase vorsichtig mit zwei Fingern (Bonsmann) ausgedrückt und danach den Mäusen ein bestimmtes Volumen der zu untersuchenden Flüssigkeit (in unseren Versuchen stets 0,5 ccm) subcutan injiziert. Die Tiere wurden darauf vier Stunden in einen kleinen runden Stoffwechselkäfig auf ein weitmaschiges Drahtnetz gesetzt, unterhalb dessen ein Behälter, der sich trichterförmig verjüngte, angebracht war, so daß der abgesonderte Harn in einem darunterstehenden Meßgläschen aufgefangen werden konnte. Nach Ablauf der

---

[1] Bonsmann: Arch. f. expl Path. u. Pharm. Bd. 174, 1934, S. 453

[2] H. Finger: Dissertation, Hamburg 1938

vier Stunden wurde die Blase abermals ausgepreßt und die gesamte Harnmenge, die aus dem spontan gelassenen und aus dem durch Auspressen der Blase gewonnenen Harn bestand, gemessen.

Zunächst bestimmten wir bei allen Gruppen mehrmals die normale Harnausscheidung, wie sie nach Injektion von 0,5 ccm einer 0,3prozentigen Kochsalzlösung eintritt.

Es zeigte sich, daß die nach subcutaner Injection von 0,5 ccm einer 0,3prozentigen Kochsalzlösung innerhalb von vier Stunden ausgeschiedene Harnmenge bei den einzelnen Gruppen etwas verschieden war und zwischen 1,0 und 1,9 ccm schwankte. Jedoch produzierten die einzelnen Gruppen bei mehrfacher Wiederholung dieses Versuches immer wieder annähernd die gleichen Harnmengen. Die Unterschiede bei derartigen Kontrollversuchen betrugen nur etwa ± 0,2 ccm.

Die Prüfung auf die diuretische Wirksamkeit der zu untersuchenden Pharmaca ging in der Weise vor sich, daß wir das zu prüfende Präparat in bestimmter Menge in 0,3prozentiger Kochsalzlösung lösten und dann hiervon jedem Tier 0,5 ccm subcutan injizierten. Die innerhalb von vier Stunden von den einzelnen Versuchsgruppen gelieferten Harnmengen verglichen wir dann mit den Normalwerten. Zwischen den einzelnen Versuchen gönnten wir den Tieren stets eine Ruhepause von vier bis fünf Tagen.

Theophyllin

Zur Prüfung der diuretischen Wirksamkeit des Theophyllins injizierten wir zunächst jeder Maus 1,5 mg Theophyllino-Natrium aceticum in 0,5 ccm der 0,3prozentigen Kochsalzlösung gelöst subcutan. Diese Menge entspricht 1,08 mg Theophyllinbase. Die tödliche Dosis dieses Purinkörpers beträgt nach den Untersuchungen von Mühe[3] 0,36 mg Theophyllino-natrium aceticum bzw. 0,26 mg Theophyllinbase pro g Körpergewicht. Bei einer 15 g schweren Maus würden also erst 3,9 mg Theophyllinbase tödlich wirken. Die bei unseren Versuchen injizierte Dosis konnte den Tieren also noch nicht gefährlich werden.

Das Ergebnis zeigt die Tabelle I.

Tabelle I

Gruppe	Normalausscheidung ccm Urin	1,545 mg Theophyllino-Natr. acet. (= 1,08 mg Theophyllinbase) ccm Urin
5	1,7	3,7
6	1,15	3,4
7	1,7	3,3
8	1,55	3,5
9	1,5	4,9
10	1,1	3,4
11	1,7	3,4
12	1,7	2,8

[3] Mühe: Dissertation, Hamburg 1939

Die Tabelle zeigt, daß die von uns gewählte Theophyllingabe eine sehr kräftige diuretische Wirkung besitzt. Die Urinmenge betrug meist das zweifache, in einigen Fällen das zweieinhalb bis dreifache der Norm.

Novophyllin

Als nächstes Präparat untersuchten wir das Novophyllin, das in Ampullen in den Handel kommt. Jede Ampulle enthält in 2,0 ccm gelöst 0,27 g Novophyllin, das sich nach Angaben der herstellenden Firma (Desiti-Werk C. Klinke) aus 72% Theophyllinbase, 18% Aethylendiamin und 10% Luminal zusammensetzt. Es sind daher in 1,0 ccm der Ampullenlösung 97,2 mg Theophyllin, 13,5 mg Luminal und 24,3 mg Aethylendiamin enthalten.

Zu unseren Versuchen benutzten wir zunächst eine sehr starke Verdünnung des Präparats, um festzustellen, ob Theophyllin durch die Verbindung mit Aethylendiamin eine erhebliche Wirksamkeitssteigerung erfährt. Dies ist in der Tat der Fall. Bei subcutaner Injektion von 0,5 ccm einer Lösung von 0,28 ccm Novophyllin in 100,0 ccm der 0,3prozentigen Kochsalzlösung wurde die Urinmenge bei allen Versuchsgruppen bereits deutlich der Norm gegenüber erhöht.

Bei Injektion von 0,5 ccm einer Lösung, die 1,0 ccm der Novophyllinlösung in 100,0 ccm der 0,3prozentigen Kochsalzlösung enthält, stieg die Urinmenge auf das zwei- bis dreifache der Norm. Da diese benutzte Lösung in 100,0 ccm 97,2 mg Theophyllinbase enthielt, wurde also jedem Tier nur 0,486 mg Theophyllin verabfolgt. Die diuretische Wirkung war aber — wie aus Tabelle II hervorgeht — etwa die gleiche wie nach Injektion von 1,545 mg Theophillino-Natrium aceticum (vgl. Tabelle I), obwohl den Tieren hiermit 1,08 mg Theophyllinbase zugeführt wurde.

Diese Versuche zeigen also, daß Novophyllin — bezogen auf den Theophyllingehalt — mehr als doppelt so stark harntreibend wirkt als Theophyllino-Natrium aceticum. Eigenartigerweise ließ sich die Harnmenge durch Verabfolgung größerer Novophyllinmengen nicht weiter steigern.

Tabelle II

Gruppe	Normalausscheidung ccm Urin	Novophyllin (0,486 mg Theoph.) ccm Urin
1	1,65	2,4
2	1,3	2,4
3	1,9	2,9; 3,3
4	1,2	2,6; 2,7
5	1,7	3,0; 3,9; 2,8
6	1,15	2,7; 3,1; 3,4
7	1,7	2,8; 3,0
8	1,55	2,7; 3,2
9	1,5	2,7
10	1,1	2,8
11	1,7	2,5
12	1,7	2,1

Bemerkenswert ist, daß bei diesen Versuchen eine auffällig starke Erregung der Mäuse beobachtet wurde. Diese Unruhe, die mehrere Stunden anhielt, war oft so stark, daß es in einigen Fällen zu schweren Beißereien unter den Versuchstieren kam. Diese Beobachtung ist bemerkenswert, da das Präparat Luminal enthält und außerdem nur in verhältnismäßig geringer Menge verabfolgt worden war.

Die starke diuretische Wirkung des Novophyllins dürfte auf die Verbindung von Theophyllin mit Aethylendiamin beruhen, denn Luminal hat nach den Untersuchungen von Bonsmann[1] eine diuresehemmende Wirkung.

In eigenen Versuchen, bei denen die 15 bis 16 g schweren Mäuse je 0,15 mg Luminal in 0,5 ccm der 0,3prozentigen Kochsalzlösung subcutan injiziert erhielten, konnte diese Angabe bestätigt werden (vergl. Tabelle III). Allerdings ist die in dem Präparat Novophillin enthaltene Menge Luminal nicht sehr groß und dürfte bei den oben angeführten Versuchsergebnissen (Tabelle II) nicht allzusehr ins Gewicht fallen. Mit 0,486 mg Theophyllin wurde den Mäusen jedenfalls nur 0,07 mg Luminal injiziert. Diese Dosis bewirkt aber bei normalen Tieren nur eine ganz unerhebliche Diuresehemmung. Immerhin ist anzunehmen, daß der Gehalt des Novophyllins an Luminal die Ursache dafür ist, daß sich die diuretische Wirkung, wie bereits erwähnt, nicht über ein gewisses Maß steigern läßt.

Tabelle III

Gruppe	Normalausscheidung ccm Urin	0,15 mg Luminal ccm Urin
7	1,7	1,4
8	1,55	1,2
9	1,5	1,3
10	1,1	0,9
11	1,7	1,2
12	1,7	1,0
13	1,55	1,3
14	1,5	1,1

Da angenommen werden muß, daß an der starken diuretischen Wirksamkeit des Novophyllins das Aethylendiamin einen wesentlichen Anteil hat, so prüften wir in weiteren Versuchen, wie sich Aethylendiamin, allein gegeben, auf die Harnproduktion auswirkt.

Nach Barbout und Hjort[4] handelt es sich bei dem Aethylendiamin um einen ziemlich ungiftigen Körper. Die kleinste tödliche Dosis für Mäuse soll 15 mg pro 20 g Gewicht betragen. Auf das Zentralnervensystem der Frösche soll Aethylendiamin ähnlich wie Methan wirken. Kaninchen zeigen nach einer fast letalen Dosis — intravenös oder subcutan 0,4 g pro kg — eine vorübergehende Erregung der Atmung, Sinken der Körpertemperatur und Diarrhöe. Tränen-, Nasenschleimhaut- und

[4] Barbout und Hjort: Ber. über ges. Physiol. Bd. 6, S. 529

Speichelsekretion wurden nicht vermehrt. Der einzige konstante Effekt bei kleineren Dosen (0,1 g pro kg) soll Hypothermie sein. Tägliche Injektionen rufen in dessen nach Barbour und Hjort bereits nach vier Tagen eine Immunität gegen diese Wirkung hervor. Auch nach einer Behandlungsdauer von zehn Tagen sollen sich keine Wirkungen auf das Körpergewicht, auf Nieren, Herz oder Blut zeigen.

Ferner wurde von den Autoren gefunden, daß das Aethylendiamin die Aktivität und den Tonus der glatten Muskulatur herabsetzt. Der Blutdruck wird bei Katzen, Hunden und Kaninchen oft schon durch eine Gabe von 0,1 mg herabgesetzt. Dieser Effekt soll nicht kardial bedingt sein und ist nicht auf ein bestimmtes Gebiet des Gefäßsystems beschränkt. Nach Verletzung des Rückenmarks und nach vollständiger Nikotinisierung setzt Aethylendiamin den Blutdruck nicht herab. Die blutdrucksenkende Wirkung wäre demnach zentraler Natur.

Um die Frage zu klären, ob Aethylendiamin einen Einfluß auf die Harnsekretion ausübt, injizieren wir den 15 bis 17 g schweren Mäusen 2,7 mg Aethylendiamin in 0,5 ccm der 0,3prozentigen Kochsalzlösung gelöst subcutan. Es zeigte sich, daß diese Menge eine sehr beträchtliche diuretische Wirkung ausübt (vgl. Tabelle IV).

Tabelle IV

Gruppe	Normalausscheidung ccm Urin	Aethylendiamin (2,7 mg) ccm Urin
1	1,65	2,8
2	1,3	2,7
3	1,9	3,6
4	1,2	3,0
5	1,7	3,3
6	1,15	3,7
7	1,7	3,2
8	1,55	3,8

Die Tabelle zeigt also, daß die von uns gewählte Dosis bewirkt, daß die normalerweise zu erwartende Harnmenge zumeist auf das zwei- bis zweieinhalbfache erhöht wird.

Einige weitere Versuche ergaben, daß die diuretische Wirkung des Aethylendiamins von ähnlicher Stärke wie die harntreibende Wirkung von Ammoniumchlorid ist. Es zeigte sich nämlich, daß die subcutane Injektion von 2,4 mg Ammoniumchlorid gelöst in 0,5 ccm 0,3prozentiger Kochsalzlösung pro Maus eine starke Vermehrung der Urinausscheidung verursacht (vgl. Tabelle V).

Tabelle V

Gruppe	Normalausscheidung ccm Urin	2,4 mg NH_4Cl ccm Urin
3	1,9	2,6
18	1,0	2,1

Als letzten Stoff untersuchten wir das Euphyllin, das, nach Angabe der herstellenden Firma (Byk — Guldenwerke), 78% Theophyllin und 22% Aethylendiamin enthält.

Wir benutzten für unsere Versuche die von der Firma gelieferten Ampullen zu 10 ccm, bei denen 0,24 g Euphyllin in 10 ccm Aqua bidestillata enthalten sind. In 10 ccm sind mithin 187,2 mg Theophyllinbase vorhanden.

Von dieser Lösung stellten wir für unsere Versuche geeignete Verdünnungen her, indem wir 5,4 ccm, d. h. 130 mg Euphyllin, bzw. 101 mg Theophyllinbase, auf 50 ccm mit 0,3prozentiger Kochsalzlösung verdünnten. In 0,5 ccm waren dann 1,36 mg Euphyllin, bzw. 1,01 mg Theophyllinbase, enthalten. Die Tiere erhielten also bei Injektion von 0,5 ccm ungefähr die gleiche Theophyllinmenge wie die in Tabelle I aufgeführten, die mit Theophillino-Natrium aceticum behandelt worden waren.

Das in Tabelle VI aufgeführte Ergebnis dieser Versuche zeigt, daß die diuretische Wirkung erheblich stärker war als bei den in der Tabelle I wiedergegebenen Versuchen. Dieser Befund ist jedoch nicht überraschend, da sich ja auch die zweite Komponente des Euphyllins, das Aethylendiamin, als diuretisch wirksam erwiesen hat.

Tabelle VI

Gruppe	Normalausscheidung ccm Urin	1,36 mg Euphyllin ccm Urin
9	1,5	4,7
10	1,1	3,6
11	1,7	4,1
12	1,7	3,7

Bei diesen Versuchen zeigte sich ferner stets eine sehr starke Erregung der Tiere. Einzelne Tiere bissen dabei wild um sich, so daß mehrere Mäuse während des Versuches an den Verletzungen eingingen.

Tierexperimentelle Untersuchungen über die diuretische Wirkung des Euphyllins liegen bisher nur von Lemesic[5] vor. Lemesic prüfte die Wirksamkeit von Euphyllin an der isolierten Kaninchenniere. Hierbei wurde ein in physiologischer Kochsalzlösung gelöster Farbstoff in die Art. renalis eingeleitet. Dabei ergab sich, daß die aus der Vena renalis ausfließende Lösung nur mehr ganz schwach gefärbt war, ungefähr zehnfach schwächer als die aus dem Ureter tropfende. Wurde jetzt zu der physiologischen Kochsalzlösung Euphyllin zugesetzt, so zeigte es sich, daß in der gleichen Zeiteinheit die Ausscheidung des Farbstoffes etwa den doppelten Wert erreichte. Der Versuch ergab mithin, daß sich die Diurese des isolierten Organs durch die Euphyllingabe um das Zweifache erhöhen läßt.

[5] Lemesic: Klin. Wo., 1923, Nr. 31

In einer weiteren Untersuchungsreihe wiederholten wir die oben beschriebenen Diureseversuche, indem wir den Mäusen jetzt von allen untersuchten Präparaten nur die halbe Dosis in 0,5 ccm der 0,3prozentigen Kochsalzlösung gelöst injizierten.

Es zeigte sich, daß diese Gaben bereits ausreichten, um bei den Tieren, die Theophyllino-Natrium aceticum erhalten hatten, die Urinmenge nahezu zu verdoppeln, bei den Tieren, die Novophyllin oder Euphyllin bekommen hatten, sie zu verdoppeln oder zu verdreifachen. Tabelle VII zeigt das Ergebnis dieser Versuche.

Tabelle VII

Gruppe	Normalausscheidung ccm Urin	(0,773 mg Theoph.-Natrium aceticum) ccm Urin
21	1,8	2,8
22	1,3	2,2
23	1,7	3,4
24	1,5	3,1

Gruppe	Normalausscheidung ccm Urin	Novophyllin (0,234 mg Theoph. base) ccm Urin
21	1,8	2,3
22	1,3	2,1
23	1,7	2,5
24	1,5	2,4

Gruppe	Normalausscheidung ccm Urin	0,675 mg Euphyllin (0,5 mg Theophyl. base) ccm Urin
21	1,8	5,2
22	1,3	4,1
23	1,7	4,7
24	1,5	4,6

Auch diese Versuche zeigen deutlich, daß Euphyllin — und in etwas schwächerem Grade auch Novophyllin — stärker harntreibend wirken als es dem Gehalt an Theophyllin entspricht. Dieser Befund erklärt sich aus dem Ergebnis der Prüfung des als Lösungsmittel verwandten Aethylendiamins, das allein verabfolgt bereits eine kräftigte diuretische Wirkung aufweist.

Zusammenfassung

Die weiße Maus eignet sich gut zum Nachweis der Wirkung harntreibender Mittel. Es empfiehlt sich, eine große Anzahl dieser billigen und gut zu haltenden Tiere zur Untersuchung diuretischer Mittel heranzuziehen, um dadurch individuelle Unterschiede möglichst auszuschalten.

Bei der Prüfung der harntreibenden Wirkung verschiedener Theophyllinpräparate des Handels zeigten sich Euphyllin und Novophyllin, bezogen auf den Gehalt an Theophyllinbase, stärker wirksam als Theophyllino-Natrium aceticum.

Weitere Versuche ergaben, daß Aethylendiamin, das in Euphyllin und Novophyllin als Lösungsmittel für Theophyllin dient, allein gegeben, ebenfalls eine deutliche harntreibende Wirkung ausübt. Hierdurch erklärt sich die Überlegenheit dieser beiden Präparate über Theophyllino-Natrium aceticum.

Zum Schluß ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Dozent Dr. Oelkers für die Überlassung des Themas und für manche Anregung und Unterstützung bei der Zusammenstellung der Arbeit meinen ergebenen Dank auszusprechen.

LEBENSLAUF

Am 2. Dezember 1913 wurde ich als Sohn des Kriminalsekretärs Ernst Huttard in Hamburg geboren. Am 27. Februar 1933 verließ ich mit dem Zeugnis der Reife die Thaer Oberrealschule in Hamburg. Daran anschließend widmete ich mich dem Studium der Zahnheilkunde an der Hansischen Universität, an der ich am 8. Dezember 1937 die Approbation als Zahnarzt erhielt.

Ernst Huttard